外洋海域から分離された炭化水素分解細菌の属組成と分解活性

東原孝規・佐藤昭雄

(1984年11月16日受理)

Generic Composition and Degradation Activity of Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from the Open Sea

Takanori HIGASHIHARA* and Akio SATO*

Generic composition and degradation activity of hydrocarbon-degrading bacteria in pelagic seawater were studied. Eighty six strains of hydrocarbon-degrading bacteria were isolated from seawater of the Western North Pacific Ocean, Eastern Indian Ocean and South China Sea.

n-Tetradecane (*n*-C₁₄) degradation rate (*n*-C₁₄ 20 μl/10 ml medium) at 20°C for 14 days was under 25% for about half the number (42 strains) of the isolated bacteria. Bacterial strains in which the *n*-C₁₄ degradation rate was over 50%, were only 12% (10 strains) of the isolates.

The generic composition was determined for 41 isolates among the 86 strains. Bacterial family and genera of identified strains were *Pseudomonas* (54%), *Alcaligenes* (22%), *Acinetobacter-Moraxella* (10%), *Flavobacterium* (10%) and *Vibrionaceae* (5%). The members of genus *Pseudomonas* were predominant among the hydrocarbon-degrading bacteria distributed in the regions studied. There was no distinct difference in *n*-C₁₄ degradation rate among the bacterial genera.

The present study showed that hydrocarbon-degrading bacteria of various genera were widely distributed in pelagic areas. It is thus suggested that they play the main role in the process of natural self-purification of the seawater from hydrocarbons in these environments.

海洋の炭化水素分解細菌は、海洋の油濁に対する自浄作用に重要な働きをしていることが示唆され、^{1,2)} 石油により汚染されている沿岸海域や航路海域に炭化水素分解細菌が最も多く分布していることが知られている。^{3,4)} そして、これらの海域から多くの炭化水素分解細菌が分離され、それらの種類については、BARTHA and ATLAS⁵⁾ の総説に属レベルでまとめられている。また、それら分離細菌の炭化水素分解能に関する報告もかなりみられる。⁵⁻⁹⁾

一方、外洋のような非汚染海域では炭化水素分解細菌が非常に少ないか、またはほとんど見いだされないとわれ、^{3,4,10)} これらの海域に分布する炭化水素分解細菌の種類やその炭化水素分解活性に関する知見はあまり得られていない。

しかしながら、著者らは前報¹¹⁾ で明らかにしたように、外洋のいずれの海域においても炭化水素分解細菌は分布し、油濁の浄化に寄与していることが推察された。このような外洋海域に生息する炭化水素分解細菌はどのような種類で、どの程度の炭化水素分解能を有しているかを調べることは、微生物生態学的にも、また外洋海域

における油濁の自浄作用とも関連して重要である。

本研究では、以上のような観点から、前報¹¹⁾ において調査された外洋海域から炭化水素分解細菌を分離し、それら炭化水素分解細菌群の属組成や炭化水素分解活性について検討したので、これらの結果について報告する。

実験方法

炭化水素分解細菌の分離試料 各海域の観測点で採取された海水試料を 0.5% (v/v) の light gas oil を含む炭化水素分解細菌計数用 NSW 培地¹²⁾ に接種し、20°C、14 日船上で振盪培養し、MPN 法により炭化水素分解細菌数を計数した。¹¹⁾ この計数用培養試験管の中で最も良好な増殖を示した試験管の培養液を 1 白金耳とり、light gas oil 0.5% (v/v) を含む NSW 軟寒天高層培地 (寒天 0.5%, w/v) に接種し、20°C、14 日船上で培養後、5°C にて保存、持ちかえり、以下の炭化水素分解細菌の分離用試料に供した。なお、測点 20 の 0 m 層海水からの分離用試料は light gas oil の代りに *n*-テトラデカン (*n*-C₁₄) を加えた NSW 軟寒天高層培地で培養したものをを用いた。

* 工業技術院微生物工業技術研究所 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan).

Light gas oil 0.5% (v/v) を含む NSW 軟寒天高層培地は、前報¹²⁾に準じ次のように調製した。

0.5% (w/v) の寒天を加えた NSW 培地をオートクレーブ滅菌後、下記の light gas oil 乳化液を一定量加え、よく混合した後、無菌的に試験管に分注した。Light gas oil の乳化液は、45 ml の蒸留水に 0.1 ml の Tween 80 を加え、オートクレーブ滅菌した後、さらに濾過滅菌¹²⁾した 5 ml の light gas oil を添加し、sonicator にて無菌的に乳化して調製した。また $n\text{-C}_{14}$ 乳化液および $n\text{-C}_{14}$ を含む NSW 軟寒天高層培地は light gas oil を $n\text{-C}_{14}$ に置換えて、前記同様に調製した。

炭化水素分解細菌の分離 上記の NSW 高層培養から白金耳にて菌体を取り、light gas oil 0.5% (v/v) を加えた NSW 培地 (I) 10 ml を含む大型試験管 (25×200 mm) に接種し、20°C、13~14 日振盪培養した。この培養液の 80% 熟成海水による段階希釈液 0.1 ml を Buck and CLEVERDON¹³⁾ の方法により、前記高層培地と同様に調製した light gas oil 0.5% (v/v) を含む寒天平板培地 (寒天 2%, w/v) に塗抹し、20°C、10~14 日培養した。この培地上に生成したコロニーを釣菌し、I の培地に接種、20°C、7~10 日、前記同様に培養し、培養液の濁度が McFarland No. 2 以上、またはプロモチモールブルー (BTB) で酸性反応を呈する¹²⁾ 菌株について、以下の方法により純粋分離を行った。

前記菌株の培養液を NSW 寒天平板培地 (II, 基質は 0.5 ml の light gas oil をしこませた濾紙を 2.1×9.0 cm のペトリ皿の上蓋においてペーパーの状態に供給) に前記同様に塗抹し、20°C、10~14 日培養後、形成したコロニーを釣菌し、NSW 斜面培地 (III, 基質は 0.5 ml の light gas oil を斜面培地上に注入して供給) に接種し、20°C、7~10 日培養した。この斜面培養で得られた菌株を、さらに上記 II の培地を用い、平板培養法により純粋分離を行った。なお、分離菌の純粋性試験には Marine Agar 2216 (Difco 製) の平板培地を II の培地と平行して用いた。また純粋分離菌株の保存は III の培地を用いて行った。

分離細菌の炭化水素分解能試験 前記純粋分離菌株を、 $n\text{-C}_{14}$ 20 μl を加えた NSW 培地 10 ml を含む大型試験管にて、20°C、14 日振盪培養した後、培養液の濁度または BTB 呈色で前記と同様な反応を示す菌株について、下記の方法にて $n\text{-C}_{14}$ の分解率を算出し、分解率 10% 以上を示す菌株を炭化水素分解細菌とした。

$n\text{-C}_{14}$ の定量 上記培養液を 1N HCl にて酸性にし、10 ml の $n\text{-ヘキサン}$ ($n\text{-C}_6$) を加え、振盪抽出した後、遠心分離により $n\text{-C}_6$ 層を分離した。この抽出操作を 2

回繰り返して、得られた $n\text{-C}_6$ 抽出液に、内部標準物質の $n\text{-ペンタデカン}$ を一定量加え、 $n\text{-C}_6$ にて 25 ml 定容量とした。この抽出液の一定量を前報¹²⁾に示した条件のガスクロマトグラフィーにより分析した。分解率は、菌を接種しない培地を同条件で振盪した対照培地中の $n\text{-C}_{14}$ 量を基準にして、それぞれの培養液中の $n\text{-C}_{14}$ の減少量から求めた。

分離細菌の分類同定 分離細菌の分類学的同定は、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.¹⁴⁾ に、一般にしたがっている清水¹⁵⁾ の「海水環境から分離される従属栄養細菌の同定図式」に基づいて行った。なお、細胞形態および生理的性質は Marine Agar 2216 の斜面培地で培養した菌体を用いて検討した。O-F テストは海洋細菌用の LEIFSON 法¹⁶⁾ によった。

結果および考察

分離菌株の炭化水素分解活性 表面海水から分離された炭化水素分解細菌は、前報¹¹⁾に示した観測点のうち、西部北太平洋で 21 菌株 (St 1, 6; St 2, 12; St 4, 3),* 東部インド洋で 12 菌株 (St 5, 9; St 6, 3), ベンガル湾で 8 菌株 (St 14, 7; St A, 1), マラッカ海峡 (St C) で 1 菌株および南シナ海で 14 菌株 (St F, 2; St 20, 11; St 21, 1) 計 56 菌株であった。また、中・深層海水からは南シナ海の測点 20 の 300 m 層および 1200 m 層から 12 菌株と 4 菌株、および東部インド洋の測点 9 の 800 m 層からは 14 菌株の炭化水素分解細菌がそれぞれ分離された。これら合計 86 菌株の $n\text{-C}_{14}$ 分解活性を Table 1 に示した。

分離した炭化水素分解細菌の $n\text{-C}_{14}$ 分解活性は分離源試料の水深には概して関係なく、0 m から 1200 m 層まで、各層で分離された炭化水素分解細菌のほぼ半数の菌株は分解率 25% 以下であった。また、800 m 層から分離された炭化水素分解細菌を除き、いずれの水深から分離された炭化水素分解細菌でも、その 1~2 割程度の菌株は分解率 50% 以上を示した (Table 1)。

海洋における石油の微生物分解については、実験室的条件で得られた結果から算出したものであるが、100~960 mg/m³/day という ZoBell¹⁷⁾ の報告がある。ATLAS and BARTHA¹⁸⁾ は窒素とリンを補給した海水 100 ml に 1 ml (800 mg) の Sweden 原油を添加して、28°C、18 日培養すると、加えた原油の 70% が分解されたと述べている。

WALKER and COLWELL¹⁹⁾ および SEKI²⁰⁾ は、現場の海水による石油の分解速度を ¹⁴C でラベルした炭化水素を用いて調べている。後者によると、東京湾の表層海水

* St の次の数字および記号は測点番号、コンマの次の数字はその測点で分離された炭化水素分解細菌の菌株数をそれぞれ示したものである。St 1 の位置は 19°59.8'N, 130°00.9'E である。

Table 1. Difference of degrading strength of *n*-tetradecane among the strains of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from different depths

Depth of isolation (m)	Number of isolates			Total number of isolates (D)
	<i>n</i> -Tetradecane degradation (%)			
	10.0–24.9 (A)	25.0–49.9 (B)	>50 (C)	
0	28 (50.0)* ¹	20 (35.7)* ²	8 (14.3)* ³	56
300	6 (50.0)	5 (41.7)	1 (8.3)	12
800	6 (42.9)	8 (57.1)	0 (0)	14
1200	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	4
Total number of isolates	42 (48.8)	34 (39.5)	10 (11.6)	86

()¹: (A)/(D) × 100(%), ()²: (B)/(D) × 100(%), ()³: (C)/(D) × 100(%)*n*-Tetradecane(*n*-C₁₄) degradation rate: *n*-C₁₄ 20 μl/10 ml of medium, 20°C, 14 days, shaking culture.**Table 2.** Genera assignment of 41 isolates of hydrocarbon-degrading bacteria and their degrading strength of *n*-tetradecane

Genus	Number of isolates			Total number of isolates (D)	(D)/41 × 100 (%)
	<i>n</i> -Tetradecane degradation (%)				
	10.0–24.9 (A)	25.0–49.9 (B)	> 50 (C)		
<i>Pseudomonas</i>	12 (54.5)* ¹	7 (31.8)* ²	3 (13.6)* ³	22	53.7
<i>Alcaligenes</i>	3 (33.3)	5 (55.6)	1 (11.1)	9	22.0
<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	4	9.8
<i>Flavobacterium</i>	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	4	9.8
<i>Vibrionaceae</i>	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0)	2	4.9
Total number of isolates	20 (48.8)	15 (36.6)	6 (14.6)	41	

()¹*²*³: same as Table 1.*n*-Tetradecane(*n*-C₁₄) degradation rate: *n*-C₁₄ 20 μl/10 ml of medium, 20°C, 14 days, shaking culture.

の *n*-ヘキサデカンの分解速度は 0.1~1.3 μg/l/h であったと報告している。

また、海洋環境から分離された細菌による研究では、*Arthrobacter* sp.,⁵⁾ *Flavobacterium* sp.,^{6,7)} *Brevibacterium* sp.,⁸⁾ および *Caulobacter* sp.⁷⁾ などによる報告がある。

最近、KAWAKAMI and NISHIMURA⁹⁾ は東京湾の京浜運河の海水から分離した *Bacillus* sp. により、沿岸海水 100 ml (244 μmol inorganic N/l, 6.5 μmol PO₄-P/l) に 1 μl の *n*-ヘキサデカン (*n*-C₁₆) を加え、25°C で振盪培養すると、1.5 日で分解されたと述べている。また NAGATA⁹⁾ は神戸港の海水から分離した *Flavobacterium* sp. と *Corynebacterium* sp. の *n*-C₁₆ の分解率 (*n*-C₁₆ 2.5 ml/l 培地) は、20°C, 14 日で 50~60% であったと報告している。

さて外洋海域から分離された炭化水素分解細菌の *n*-C₁₄ 分解率を Table 1 に示したが、分離菌の約 1 割の菌株は、20°C, 14 日の振盪培養で分解率 (*n*-C₁₄ 20 μl/10 ml 培地) 50% 以上を示した。これは培地組成など実験条

件がことなるので、直接比較するには問題があると思われるが、前記 NAGATA の沿岸海域から分離された細菌とはほぼ同程度の分解活性を示した。

微生物による石油の分解は、多くの場合何種類かの微生物の協働により行われると推察されている。²¹⁾ このようなことから、外洋海域から分離された炭化水素分解細菌のほぼ半数の菌株は、*n*-C₁₄ の分解率 25% 以下と弱い分解活性しか認められなかったが、これらの菌も、分解率 50% 以上を示す分解活性の強い菌との協働により、外洋海域の油濁の浄化に寄与しているものと推察される。

炭化水素分解細菌の属組成 各海域の海水試料から分離された炭化水素分解細菌 86 菌株のうち、41 菌株について属レベルまでの分類同定を行った。その結果を Table 2 に示した。

炭化水素分解細菌の属組成は、*Pseudomonas* 属が最も多く 54%、次いで *Alcaligenes* 属 22%、*Acinetobacter-Moraxella* 群 10%、*Flavobacterium* 属 10% および

Vibrionaceae 科 5%であった。以上より、外洋海域から分離された炭化水素分解細菌の優占種は *Pseudomonas* 属細菌であることが認められた。

また、表面海水から分離された炭化水素分解細菌のうち、同定された 33 菌株の各海域別の属組成をみると、西部北太平洋で *Pseudomonas* 属 6 菌株、*Vibrionaceae* 科 2 菌株、*Alcaligenes* 属 1 菌株、東部インド洋で *Pseudomonas* 属 7 菌株、*Acinetobacter-Moraxella* 群 3 菌株、ベンガル湾で *Alcaligenes* 属 5 菌株、*Pseudomonas* 属 1 菌株、マラッカ海峡で *Acinetobacter-Moraxella* 群 1 菌株および南シナ海で *Pseudomonas* 属 3 菌株、*Flavobacterium* 属 3 菌株、*Alcaligenes* 属 1 菌株であった。

中・深層海水から分離された炭化水素分解細菌のうち、同定された菌株の属組成では、南シナ海の測点 20 の 300 m 層で *Pseudomonas* 属 3 菌株、*Alcaligenes* 属 2 菌株、*Flavobacterium* 属 1 菌株、および東部インド洋の測点 9 の 800 m 層で *Pseudomonas* 属 2 菌株が認められた。

各属菌株の $n-C_{14}$ 分解率を Table 2 に示したが、各属菌株による分解率は属間で大きな差は認められなかった。また各属のほぼ半数の菌株は $n-C_{14}$ 分解率 25% 以下であった。

海洋環境から分離される炭化水素分解細菌の種類については、BARTHA and ATLAS²⁾ の総説にまとめられている。これによると、最も一般的な炭化水素分解細菌の属としては、*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* および *Flavobacterium* があげられているが、そのほかに *Alcaligenes* 属を含む 12 の細菌属が認められている。本研究で外洋海域から分離された炭化水素分解細菌も、これらの属に含まれる細菌であった (Table 2)。

SIMIDU ら²³⁾は、同研究航海 (KH-76-5) で PPES-II 培地²³⁾を用いて、ベンガル湾および南シナ海における従属栄養細菌の分布を調査している。これによると、*Vibrionaceae* 科が最も多く分離細菌数の 32%、ほか優勢な属としては *Pseudomonas* (15%)、*Acinetobacter-Moraxella* 群 (10%)、*Alcaligenes* (7%)、*Flavobacterium* (6%) および *Micrococcus* (5%) を認めている。

本調査結果では、*Micrococcus* 属を除き上記従属栄養細菌属のいずれの属においても炭化水素分解細菌がみられたが、炭化水素分解細菌の優占属は前記従属栄養細菌のそれとことなり *Pseudomonas* 属であった。しかし SIMIDU ら²³⁾によると、属の組成は海域によってことなり南シナ海の表面海水には *Pseudomonas* 属 (44%) が最も多くみられたと報告している。

また、SUGAHARA ら²⁴⁾は、熱帯沿岸水域のシンガポー

ル東ジョホール水道表層海水における従属栄養細菌の分布を調べているが、分離された従属栄養細菌では、*Pseudomonas*, *Vibrio* および *Flavobacterium* が優勢な属種であったと述べている。

海洋に分布する炭化水素分解細菌の属種については、MULKINS-PHILLIPS and STEWART²⁵⁾ による北西部太平洋の海水および沿岸堆積物に関する報告がある。これによると、SHEWAN らの方法により同定されているが、*Nocardia* および *Achromobacter* 属以外は本研究で得られた属と同様な細菌属を認めている。POLYAKOVA¹⁾ の Neva 湾の調査では、KRASSILNIKOV の分類に従っているが、炭化水素分解細菌として、*Pseudomonas* 属 11 種、*Mycobacterium* 属 5 種、*Bacterium* 属 4 種、*Pseudobacterium* 属 2 種、*Micrococcus* 属 2 種および *Sarcina* 属 1 種を認めている。そしてこれらの中でも *Pseudomonas* 属および *Mycobacterium* 属の細菌が海水中の炭化水素の分解に主として働いていると述べている。

清水²¹⁾は、その総説の中で MIRONOV による黒海における調査結果を紹介している。それによると、前記 POLYAKOVA と同様な分類に従っているが、黒海から分離された炭化水素分解細菌の種類は *Pseudomonas*, *Pseudobacterium*, *Bacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Chromobacterium* および *Mycobacterium* の 8 属 196 種にわたっているが、その中でも *Pseudomonas* 属細菌が多いと報告されている。また岡山県水島の石油流出事故のとき、海水から *Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属および *Corynebacterium* 属の細菌を分離している。²⁶⁾

本調査結果においても Table 2 に示したように、*Pseudomonas* 属が炭化水素分解細菌の優占属として認められた。

BUSHNELL and HAAS²⁷⁾ は種々の *Pseudomonas* 属細菌の保存菌株についてケロシン資化性を調べた結果、*Pseudomonas* 属細菌のほとんどはケロシンで良好な増殖を示すことを認めている。このことから、炭化水素利用能はこの属の一般的な菌の性質であると述べている。

以上のようなことから、*Pseudomonas* 属細菌はいずれの海域においても優勢な炭化水素分解細菌として分布し、海洋油濁の浄化に主要な働きをしているものと推察される。

要 約

1) 西部北太平洋、東部インド洋および南シナ海の海水から 86 菌株の炭化水素分解細菌を分離し、それらの分解活性を調べた。その結果、分離菌の約半数の菌株は $n-C_{14}$ 分解率 ($n-C_{14}$ 20 μ l/10 ml 培地, 20°C, 14 日) 25% 以下の弱い分解活性しか認められなかった。しかし分離菌の約 1 割の菌株は分解率 50% 以上を示し、沿岸海域

から分離された分解菌とほぼ同程度の分解活性を示した。

2) 上記 86 菌株のうち、41 菌株について属レベルまでの分類同定を行った。その結果、これらの属組成は、*Pseudomonas* 属 54%、*Aclaligenes* 属 22%、*Acinetobacter-Moraxella* 群 10%、*Flavobacterium* 属 10% および *Vibrionaceae* 科 5% であった。これより *Pseudomonas* 属細菌は外洋海域においても優勢な炭化水素分解細菌として油濁の浄化に主要な働きをしているものと思われる。また、これら各属菌株の $n\text{-C}_{14}$ 分解率を比較した結果、属間で分解率に大きな差異はみられなかった。

3) 以上より、外洋海域においても沿岸海域と同様に炭化水素分解能を有する細菌が広く分布し、外洋海域の油濁に対する自浄作用に寄与しているものと推察される。

終りに、本研究の遂行にあたり、終始御指導を賜った東京大学海洋研究所名誉教授賀信夫博士ならびに細菌の分類同定について有益な御助言を賜った同研究所助教授清水 潮博士に謹んで感謝の意を表する。また、船上での実験に御協力いただくと共に有益な御助言をいただいた東京大学海洋研究所前田昌調博士、故赤木美治博士、試料採取に御協力いただいた同研究所長尾一彦氏（現在農林水産省）に、さらに本研究調査に御協力いただいた同研究所研究船白鳳丸田玉一郎船長ならびに乗組員の方々に心から感謝の意を表する。さらに、炭化水素分解細菌の分離および分離菌株の炭化水素分解試験に御協力いただいた宝酒造株式会社中央研究所西尾修治氏に深く感謝の意を表する。なお、石油製品を分与していただいた丸善石油株式会社千葉製油所に深謝の意を表する。

文 献

- 1) I. N. POLYAKOVA: *Mikrobiologiya*, **31**, 1076-1081 (1962).
- 2) R. BARTHA and R. M. ATLAS: *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 225-266 (1977).
- 3) C. E. ZOBELL: *Proc. API/FWPCA Conference on Prevention and Control of Oil Spills*, API Publ. No. 4040, American Petroleum Institute, Washington, 1969, pp. 317-326.
- 4) O. G. MIRONOV: *Oceanology*, **10**, 650-656 (1970).
- 5) A. REISFELD, E. ROSENBERG, and D. GUTNICK: *Appl. Microbiol.*, **24**, 363-368 (1972).
- 6) R. M. ATLAS and R. BARTHA: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 297-308 (1972).
- 7) 村上昭彦・松田時雄・渡辺展宏・長沢伸一: 日本海洋学会誌, **32**, 242-248 (1976).
- 8) Y. KAWAKAMI and H. NISHIMURA: *J. Chem. Eng. Japan*, **14**, 473-478 (1981).
- 9) S. NAGATA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 781-786 (1982).
- 10) H. SEKI: *Appl. Microbiol.*, **26**, 318-320 (1973).
- 11) 東原孝規・佐藤昭雄: 日水誌, **45**, 473-483 (1979).
- 12) T. HIGASHIHARA, A. SATO, and U. SIMIDU: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1127-1134 (1978).
- 13) J. D. BUCK and R. C. CLEVERDON: *Limnol. Oceanogr.*, **5**, 78-80 (1960).
- 14) R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS (eds.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp. 1-1246.
- 15) 清水 潮: 海洋微生物 (多賀信夫編), 東京大学出版会, 東京, 1974, pp. 45-65.
- 16) E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, **85**, 1183-1184 (1963).
- 17) C. E. ZOBELL: *Adv. Water Poll. Res.*, **3**, 85-118 (1964).
- 18) R. M. ATLAS and R. BARTHA: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 309-317 (1972).
- 19) J. D. WALKER, and R. R. COLWELL: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 189-197 (1976).
- 20) H. SEKI: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 439-441 (1976).
- 21) 清水 潮: 微生物の生態 (5) 一環境汚染をめぐる (微生物生態研究会編), 学会出版センター, 東京, 1978, pp. 197-213.
- 22) U. SIMIDU, K. TSUKAMOTO, and Y. AKAGI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 425-431 (1982).
- 23) N. TAGA: *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.*, No. 12, 65-76 (1968).
- 24) I. SUGAHARA, L. C. LIM, and K. K. HOOT: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1385-1393 (1984).
- 25) G. J. MULKINS-PHILLIPS and J. E. STEWART: *Can. J. Microbiol.*, **20**, 955-962 (1974).
- 26) 余語盛男: 発酵と工業, **38**, 414-422 (1980).
- 27) L. D. BUSHNELL and H. F. HAAS: *J. Bacteriol.*, **41**, 653-673 (1941).